

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-310565

(43)Date of publication of application : 22.11.1993

(51)Int.Cl.

A61K 31/16

A61K 31/16

A61K 31/19

A61K 31/19

A61K 31/19

A61K 31/19

A61K 31/195

A61K 31/275

(21)Application number : 03-228205

(71)Applicant : UNIV ROCKEFELLER

(22)Date of filing : 03.04.1991

(72)Inventor : ULRICH PETER C  
CERAMI ANTHONY

(30)Priority

Priority number : 90 503804

Priority date : 03.04.1990

Priority country : US

## (54) HIGH GLYCOSYLATION INHIBITORY COMPOSITION FOR PROTEIN AND INHIBITORY METHOD

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject composition that contains a metabolism by- product formed by reaction of protein with glucose, comprises a substance which can react with an initial glycosylated product and is useful for inhibiting the deterioration of food products and the deterioration of animal protein in industry and for treatment.

CONSTITUTION: This composition contains, as an active ingredient, a compound of the formula: R1-CH2-R2 (R1 is CN, CO-R3; R3 is R, OH, OR, NH2, NHH2; R is a lower alkyl, etc.). The compound of the formula is, for example, methylsulfonyl acetonitrile, cyanoacetamide or the like. This compound inhibits the formation of high-degree glycosylation final product that leads the aging of protein by the crosslinking of protein thereby retarding the deterioration of food products, prolong the life time of the food products and being useful for treating a variety of diseases originating from diabetes and the trouble caused by deterioration of protein.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

## [Claim(s)]

[Claim 1] It is the constituent which controls altitude glycosylation of target protein, and is the following type.

R1-CH<sub>2</sub>-R2 (I)

A proteinic altitude glycosylation control constituent characterized by providing the following the inside [ ] of a formula — R1 — CN or — CO—R3; R3 — R, — OH, — OR, — NH<sub>2</sub>, — NHNH<sub>2</sub>, and — NHR; R — two R1 — the same — Or they are — SO<sub>2</sub>R, — CNH—NH<sub>2</sub>, or — CO—NHCH<sub>2</sub>—COOH additionally.; R A low-grade alkyl group, R1 and R2 are separately chosen from — CO—R3, and when it is R, — OR, or — NHR, R3 however, a low-grade alkyl portion you may be alkane diyl bridge formation of 1-5 carbon atoms which combine a molecule and form cyclic structure — compound; come out of and expressed — it is chosen out of from among those acid addition salt; that is pharmaceutically conformable, and those mixture; — pharmaceutical — a compound of an effective dose The support

[Claim 2] In order to control altitude glycosylation of target protein in an animal, it is the medicine manufacture constituent with which the animal concerned is medicated, and it is the following formula. R1-CH<sub>2</sub>-R2 (I) the inside [ ] of a formula — R1 — CN or — CO—R3; R — two R1 — the same — Or they are — SO<sub>2</sub>R, — CNH—NH<sub>2</sub>, or — CO—NHCH<sub>2</sub>—COOH additionally.; R is a low-grade alkyl group.; R3 R, — OH, — OR, — NH<sub>2</sub>, — NHNH<sub>2</sub>, — NHR, R1 and R2 are separately chosen from — CO—R3, and when it is R, — OR, or — NHR, R3 however, a low-grade alkyl portion You may be alkane diyl bridge formation of 1-5 carbon atoms which combine a molecule and form cyclic structure. A compound come out of and expressed; a medicine manufacture constituent which was chosen from from among those acid addition product; accepted pharmaceutically and those mixture; and which consists of a compound and support accepted pharmaceutically of an effective dose pharmaceutically.

[Claim 3] A constituent according to claim 1 or 2 whose R1 is a cyano group in a formula (I) of said compound and whose R3 is — SO<sub>2</sub>R, — CO—NH<sub>2</sub>, — CO—NHNH<sub>2</sub>, or two — CO—NHCO—NH.

[Claim 4] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is a methyl sulfonyl acetonitrile.

[Claim 5] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is cyanoacetamide.

[Claim 6] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is cyanoacetic-acid hydrazide.

[Claim 7] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is cyano acetyl urea.

[Claim 8] A constituent according to claim 1 or 2 whose R1 is — CO—R3, whose R3 is an amino group in a formula (I) of said compound and whose R2 is the same radical as R1, or two — CNH—NH.

[Claim 9] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is propane diamide.

[Claim 10] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is 3-amino-3-imino propane AMIDOMONO hydrochloride.

[Claim 11] A constituent according to claim 1 or 2 whose R1 is three — CO—R, whose R3 is a hydroxy amino group in a formula (I) of said compound and whose R2 is the same radical as R1, or — CO—OR radical.

[Claim 12] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is a malonic acid.

[Claim 13] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is a malonic-acid monomethyl potassium.

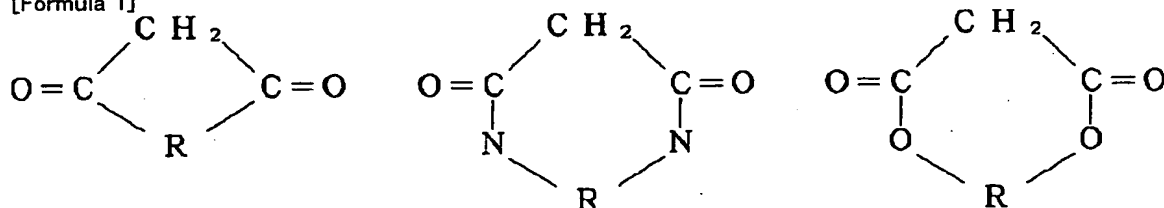
[Claim 14] A constituent according to claim 1 or 2 whose R1 is three — CO—R in a formula (I) of said compound and whose R3 R and R2 are the same as R1, or is a — CO—NH—CH<sub>2</sub>—COOH radical.

[Claim 15] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is 2 and 4-pentane Dion.

[Claim 16] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is the aceto acetyl glycine.

[Claim 17] It is the constituent according to claim 1 or 2 which R1 is three — CO—R, and R3 is — R, — NHR, or — OR radical in a formula (I) of said compound, and makes alkane diyl bridge formation between two \*\*\*\* of a molecule with which R2 is the same as R1 with a molecule, and an alkyl group of R forms a following-type compound.

## [Formula 1]



[Claim 18] A constituent according to claim 17 with which R contains 1-5 carbon atoms.

[Claim 19] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compounds are 5 and 5-dimethyl -1 and

3-cyclohexane Dion.

[Claim 20] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is malonic-acid dihydrazide.

[Claim 21] A constituent according to claim 1 or 2 said whose compound is a methyl sulfonyl acetonitrile.

[Claim 22] It is the method of controlling altitude glycosylation of target protein, and is the following formula.

R1-CH2-R2 (I)

A method including contacting a constituent of an effective dose characterized by providing the following in target protein the inside [ ] of a formula — R1 -CN or -CO-R3; R — two R1 — the same — Or they are -SO3R, -CNH-NH2, or -CO-NHCH2-COOH additionally.; R is a low-grade alkyl group.; R3 R, -OH, -OR, -NH2, -NHNH2, -NHR, R1 and R2 are separately chosen from -CO-R3, and when it is R, -OR, or -NHR, R3 however, a low-grade alkyl portion you may be alkane diyl bridge formation of 1-5 carbon atoms which combine a molecule and form cyclic structure — compound; come out of and expressed — a compound chosen from from among those acid addition product; accepted biologically and those mixture; The support

[Claim 23] It is the therapy method of the animal concerned for controlling generation of an altitude glycosylation end product of target protein in an animal, and said method is the following formula. R1-CH2-R2 (I) the inside [ ] of a formula — R1 -CN or -CO-R3; R — two R1 — the same — Or they are -SO2R, -CNH-NH2, or -CO-NHCH2-COOH additionally.; R is a low-grade alkyl group.; R3 R, -OH, -OR, -NH2, -NHNH2, -NHR, R1 and R2 are separately chosen from -CO-R3, and when it is R, -OR, or -NHR, the inside R3 of a formula however, a low-grade alkyl portion you may be alkane diyl bridge formation of 1-5 carbon atoms which combine a molecule and form cyclic structure — compound; come out of and expressed — with a compound chosen from from among those acid addition salt; accepted pharmaceutically and those mixture; How to consist of prescribing for the patient an effective dose of a medicine manufacture constituent which consists of the support accepted pharmaceutically.

[Claim 24] A way according to claim 23 R1 is a cyano group in a formula (I) of said compound, and R2 is -SO2R, -CO-NH2, -CO-NHNH2, or two -CO-NHCO-NH.

[Claim 25] A way according to claim 23 said compound is a methyl sulfonyl acetonitrile.

[Claim 26] A way according to claim 23 said compound is cyanoacetamide.

[Claim 27] A way according to claim 23 said compound is cyanoacetic-acid hydrazide.

[Claim 28] A way according to claim 23 said compound is cyano acetyl urea.

[Claim 29] A way according to claim 23 R1 is -CO-R3, R3 is an amino group in a formula (I) of said compound, and R2 is [ it is the same as R1, or ] two -CNH-NH.

[Claim 30] A way according to claim 23 said compound is propane diamide.

[Claim 31] A way according to claim 23 said compound is 3-amino-3-imino propane AMIDOMONO hydrochrolide.

[Claim 32] A way according to claim 23 R1 is -CO-R3, R3 is a hydroxy amino group in a formula (I) of said compound, and R3 is [ it is the same as R1, or ] -CO-OR radical.

[Claim 33] A way according to claim 23 said compound is a malonic acid.

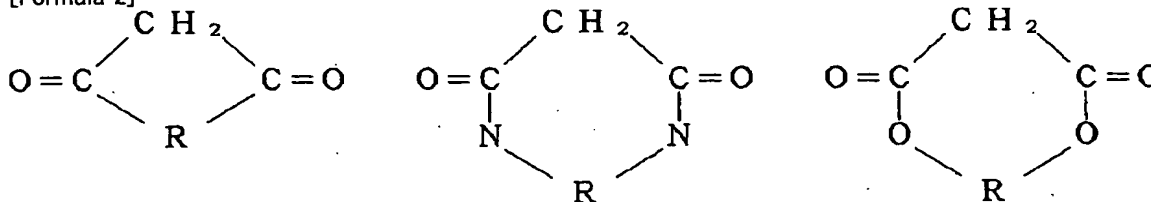
[Claim 34] A way according to claim 23 said compound is a malonic-acid monomethyl potassium.

[Claim 35] A way according to claim 23 R1 is -CO-R3, R3 is R in a formula (I) of said compound, and R2 is [ it is the same as R1, or ] a -CO-NH-CH2-COOH radical.

[Claim 36] A way according to claim 23 said compound is the aceto acetyl glycine.

[Claim 37] A constituent according to claim 23 which makes alkane diyl bridge formation between two \*\*\*\* of a molecule with which R1 is three -CO-R, R3 is -R, -NHR, or -OR radical in a formula (I) of said compound, R2 is the same as R1 with a molecule, and an alkyl group of R forms a compound of the following formula.

[Formula 2]



<TXF FR=0009 HE=025 WI=080 LX=0200 LY=2550> [Claim 39] A way according to claim 23 R contains 2-5 carbon atoms.

[Claim 40] A way according to claim 23 said compounds are 5 and 5-dimethyl -1 and 3-cyclohexane Dion.

[Claim 41] A way according to claim 1 or 2 said compound is malonic-acid dihydrazide.

[Claim 42] A way according to claim 23 said compound is a methyl sulfonyl acetonitrile.

[Claim 43] It is the method of controlling discoloration of a gear tooth produced by nonenzymatic bronzing of the oral cavity, and is the following formula. R1-CH2-R2 (I)

A method characterized by providing the following the inside [ ] of a formula — R1 -CN or -CO-R3; R — two R1 — the same — Or they are -SO3R, -CNH-NH2, or -CO-NHCH2-COOH additionally.; R is a low-grade alkyl group.; R3 R, -OH, -OR, -NH2, -NHNH2, -NHR, R1 and R2 are separately chosen from -CO-R3, and when it is R, -OR, or -NHR, R3 however, a low-grade alkyl portion you may be alkane diyl bridge formation of 1-5 carbon atoms which combine a molecule and form cyclic structure — compound; come out of and expressed — a compound chosen from from among those acid addition salts accepted pharmaceutically and those mixture; \*\* which prescribes for the patient an effective dose for altitude glycosylation end product generation control of a constituent which consists of

the support accepted pharmaceutically

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to control of the reaction of nonenzymatic glycosylation protein, the altitude glycosylation end product which this often produces, and a cross linkage in more detail about protein deterioration according [ protein ] to a glucose and in addition to this reacting with reducing sugar.

[0002]

[The background and Prior art] of invention The reaction of a glucose and protein is known from before. The first report is a report of that lipofuscin will appear into \*\*\*\* of food in 1912 by Maillard. Maillard observed the reducing sugar of a glucose or others reacting with amino acid, generating an addition product, and generating the lipofuscin by which this performed a series of dehydration and reconstruction reactions, and was stabilized (Maillard, C.R.Acad.Sci., 154, 66 - 68 pages, 1912). The food which was preserved and was able to add heat treatment was bronzed nonenzymatic by the reaction of a glucose and a polypeptide chain, and more detailed research showed that carried out the cross linkage of the protein as the result, and biological availability decreased corresponding to it.

[0003] It turned out that this reaction of reducing sugar and food protein is produced in similarity even in the living body. The stable 1-deoxy keto sill addition product which the glucose and the proteinic isolation amino group which are known as an AMADORI product (Amadori product) in this way react nonenzymatic, and produce arises with hemoglobin. In this case, the addition product which passes and is known as MOGUROBIN A1C by reconstruction by the reaction of a glucose and the amino terminal of the beta chain of hemoglobin is generated. This reaction is various body protein, for example, a lens crystalline, and a collagen again, it turned out that nerve protein is produced (Biochem.Biophys.Res.Comm. besides Bunn — 67,103-109 pages) 1975; J.Biol.Chem.252 besides Koenig, 2992-2997 pages, 1977; Maillard besides Monnier Reaction in Food and Nutrition, Editor Waller, G.A., American Chemical Society, 215,431-448 pages, 1983; and Monnier, Cerami, Clinics in Endocrinology and Metabolism, 11,431-452 pages, 1982, reference.

[0004] Furthermore, the Maillard product in a latter-part story and the lipofuscin with which spectral characteristics and a fluorescence property are similar were also observed in the living body, such as the long lasting protein of some classes, for example, old lens protein, and a collagen. The linear increment by aging of coloring matter is observed by the dura mater collagen of human being of the age of 20 to 90 years old (Biochem.Biophys.Acta besides Science besides Monnier, 211,491-493 pages, and 1981 year; Monnier, 760, 97-103 pages, 1983; Proc.Nat besides Monnier, Acad.Sci., 81,583-587 pages, 1984).

[0005] Aging of a collagen can be copied within a test tube to an interesting thing by the cross linkage caused by the glucose. Moreover, being based on a cross linkage reaction is theory-ized, and other protein and prehension of the addition product by the collagen are considered that it can explain the situation which albumin and an antibody accumulate into a kidney basic film (J. Diabetes besides Exp.Med., 158, 1739-1744 pages, and 1983 year; Kohn, 33, No.1, 57-59 pages, 1984).

[0006] In the United States Patent application No. 798,032 which is parent application of this application, method and reagent \*\* by making it react with the initial glycosylation product produced by the reaction of the beginning between the target protein and glycose for controlling generation of an altitude glycosylation end product is indicated. According to this, the reaction between an inhibitor and an initial glycosylation product arises, the continuing reaction of glycosylation protein for this to generate the latter-part story product by the cross linkage and an additional protein material is checked, and it is shown that control is performed in this way. One of the drugs shown as an inhibitor here is aminoguanidine, and, as for the test result, the usefulness is confirmed.

[0007]

[The trouble which should be solved] Although the result good about aminoguanidine and the analogue is promised, the need of deciding and developing an inhibitor further is sensed that availability and operation nature should be expanded in order to raise the facilities on a diagnosis and a therapy.

[0008]

[Abstract] According to this invention, the method and constituent for controlling proteinic altitude glycosylation (proteinic aging) are indicated. Especially this invention constituent contains the drugs for controlling the nonenzymatic cross linkage (proteinic aging) by generation of an altitude glycosylation end product. These drugs are chosen from protein, the initial glycosylation product containing the metabolism by-product by the reaction of a glucose, and the material that can react, and prevent the reaction after it. It exists in [ in-the-living-body or ] food, and the cross linkage by other reactant saccharides containing a ribose, a galactose, and fructose can also be

prevented with the method and constituent by this invention.

[0009] These drugs are the following structure expressions (I).

R1-CH2-R2 (I)

inside [ ] of a formula — R1 -CN or -CO-R3; R — two R1 — the same — Or they are -SO2R, -CNH-NH2, or -CO-NHCH2-COOH additionally.; R is a low-grade alkyl group.; R3 R, -OH, -OR, -NH2, -NHNH2, -NHR, However, you may be alkane diyl bridge formation of one to five carbon atoms which R1 and R2 are separately chosen from -CO-R3, a low-grade alkyl portion combines a molecule, and form cyclic structure when R3 is R, -OR, or -NHR, The compound come out of and expressed; it consists of a compound chosen from from among the acid addition salt; accepted pharmaceutically, and its support.

[0010] The above-mentioned compound used for this invention constituent prevents generation of the altitude glycosylation end product to which this leads proteinic aging as a proteinic cross linkage and its result so that it may react to with an initial glycosylation product.

[0011] This invention is concerned with the method of controlling proteinic aging again, and this method consists of contacting initial glycosylation protein to a kind or several sorts of this invention drugs of a constant rate, when an initial glycosylation product exists. Although a kind or several sorts of this invention drugs are applied to the target protein concerned when this invention method is used industrially, in this case, it is made to apply or introduce into it in the case of the food which introduces into that mixture in the case of a protein extract, or contains protein, and premature aging of specific food or deterioration is prevented anyway in this way.

[0012] This capacity that controls generation of an altitude glycosylation end product is all uses with the protein deterioration acting as [ uses ] a serious failure, and big value has it. For example, since it shall be easy to use food by the consumer as a more stable thing, delaying food deterioration in the field of food stuff industry brings about remarkable economical and social usefulness. If food deterioration decreases, in a commercial scene, the price can be stabilized like the case where the costs of inspection of food, removal, and migration and the ease of treating of food change. The usefulness can be further raised by making this invention drugs similarly mix into the constituent containing protein also in other industrial fields from which the proteinic ease of breaking has been a problem. A compound which is indicated in this specification will be substituted for the sulfur dioxide with which having toxicity to produce, such as a food preserver used today, an antitarnish agent, for example, allergy, and asthma, is known.

[0013] this invention method has a good curative effect especially about a collagen, an elastin, lens protein, and a kidney filament substrate film also in the protein portion in the body on which a Maillard reaction acts keenly especially. such protein deteriorates with age again (therefore, protein — aging — a term is used) as a result of diabetes mellitus. Therefore, while becoming a diabetic therapy, of course, delaying generation of an altitude glycosylation end product, or controlling on a real target will improve the quality of a life of an animal, and it will prolong a life.

[0014] People's appearance and the sanitary field of this invention drugs are also useful. It is because the discoloration dirt of the gear tooth by the cation system germicide which are anti-dental plaque agents, such as chlorhexidine, for example is prevented.

[0015] The main purpose of this invention is offering the method of controlling the proteinic advanced cross linkage produced as a final result of the reaction of the reactant saccharide of a glucose and others, and protein by controlling generation of an altitude glycosylation end product in this way.

[0016] Another purpose of this invention is the above-mentioned method, and is offering the method by the reaction with the initial glycosylation protein widely indicated to be an initial glycosylation product on these specifications, or its by-product.

[0017] Still more nearly another purpose of this invention is the above-mentioned method, and is offering the method of checking the reconstruction and the cross linkage of an initial glycosylation product which generate said altitude glycosylation end product.

[0018] Still more nearly another purpose of this invention is offering drugs with the capacity participating in a reaction with said initial glycosylation product in the above-mentioned method.

[0019] Still more nearly another purpose of this invention is offering the method of treating the failure brought about by protein aging using the above-mentioned method and drugs.

[0020] Still more nearly another purpose of this invention is offering the method of controlling dental discoloration using the above-mentioned method and drugs.

[0021] Still more nearly another purpose of this invention is offering the constituent for a therapy containing this invention drugs.

[0022] The other purposes and profits of this invention will become clear by reading the following explanation at this contractor.

[0023]

[The means and operation] for solving a trouble According to this invention, the medicine manufacture constituent containing the drugs considered to control that an altitude glycosyl end product generates in the various target protein which exists in the both sides of an animal and vegetation, and said drugs, and related method \*\* were developed. Especially according to this invention, it is the following structure expression (I). : R1-CH2-R2 (I) inside [ ] of a formula — R1 -CN or -CO-R3; R — two R1 — the same — Or -SO2R, -CNH-NH2, or -CO-NHCH2-COOH; R is a low-grade alkyl group additionally.; R3 R, -OH, -OR, -NH2, -NHNH2, -NHR, However, you may be the alkane diyl bridge formation of 1-5 carbon atoms which R1 and R2 are separately chosen from -CO-R3,

a low-grade alkyl portion combines a molecule, and is made to make it into cyclic structure when R3 is R, -OR, or -NHR. The compound come out of and expressed; it is related with the constituent containing a kind thru/or several sorts of drugs which consist of a compound chosen from from among the acid addition salt; accepted pharmaceutically, and its support.

[0024] The low-grade alkyl and the low-grade ARUKOKIN radical which are mentioned here have 1 thru/or six carbon atoms, and contain methyl, methoxy, ethyl, ethoxy \*\* propyl, propoxy one, butyl, butoxy one, pentyl, pentyloxy one, hexyl, hexyloxy radicals, and these branched chain isomers.

[0025] The combination which has substituent among the compounds contained in a formula (I) is desirable. For example, when R1 is a cyano group (CN), R2 is -SO2R, -CO-NH2, -CO-NH-NH2, or two -CO-NH-CO-NH preferably.

[0026] When R1 is -CO-R3 and R3 is an amino group, R2 is -CO-NH2 or two -CNH-NH preferably.

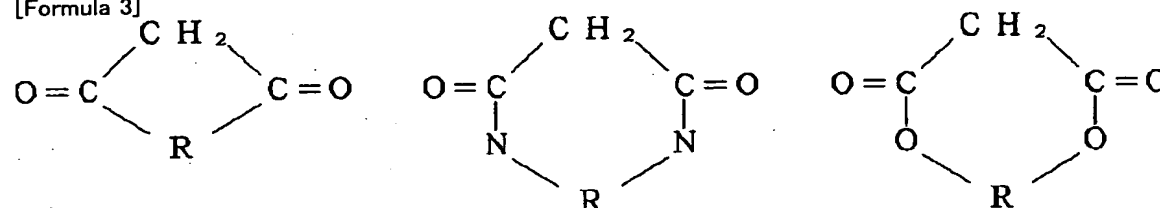
[0027] When R1 is -CO-R3 and R3 is a hydroxy group, R2 is two -CNH-NH preferably.

[0028] When R1 is three -CO-R and R3 is a hydroxy group, R2 is -CO-NH2 or -CO-OR radical preferably.

[0029] When R1 is three -CO-R and R3 is R, R2 is -CO-R radical or a -CO-NH-CH2-COOH radical preferably.

[0030] When R1 is [ R3 ] -R, -NHR, or OR radical in three -CO-R, R2 of a very desirable radical is the same as that of R1, and the alkyl group of R constitutes alkane diyl bridge formation between the two sides of molecules, and it is the compound of the following formula.

[Formula 3]



Set at a ceremony. R is the alkane diyl radical of 1-5 carbon atoms preferably. The following is contained: ( ) [ isopropylidene ] Malonate 5, the 5-dimethyl-1, 3-cyclohexane Dion (dimedone); 1, 3-cyclohexane Dion; 1, 3-cyclopentane Dion; A tetrahydrofuran -2, 4-Dion (tetronic acid); [ 2, 4-pyrrolidine Dion ] (Tetramine acid); The 1-methyl -2 and 4-pyrrolidine Dion; 5-sec-butyl -2 and 4-pyrrolidine Dion; Cyanoacetamide; N-methyl aceto acetamide; cyano acetyl urea; — the aceto acetyl glycine; malonic-acid dihydrazide; 2 and 4-pentane Dion (acetylacetone) 3-oxo-butaneamide; Methyl 4-4-dimethyl-3-oxo-pentanoate; malonic-acid; — monomethyl malonic-acid potassium (malonic-acid monomethyl ester potassium salt); and malonic-acid monoethyl hydrogen.

[0031] The above-mentioned compound can control generation of an altitude glycosylation end product about target protein. By the cross linkage of the protein which generates an altitude glycosylation end product, other protein is taken in and conditions in the living body, such as elastic reduction of the skin, formation of a wrinkling, a certain kind of kidney disease, atherosclerosis, and osteoarthritis, are invited. Similarly, in vegetation, it deteriorates by nonenzymatic bronzing, and hardens whether it rots with food, therefore stops being suitable for edible. So, the compound adopted by this invention controls such an anaphase Maillard effect, and interferes in an above-mentioned deterioration phenomenon.

[0032] According to this invention, the drugs which block generation of a fluorescence chromophore (previous statement) which was reported by the anaphase glycosylation phase, i.e., Farmar besides Pongor (previous statement) etc., especially generation of a chromophore which brings about the bad condition by diabetes mellitus or aging are used. Ideal drugs prevent the condition that protein is caught by generation of a chromophore, the cross linkage between protein, and other protein that is seen by arteriosclerosis and kidney disease etc. here.

[0033] the "initial glycosylation product" which are in the chemical property of the initial glycosylation product considered that the compound of this invention reacts, and is used in this specification — it should be thought that a term contains these [ all ]. [ various ] For example, with regards to generation of an altitude glycosylation end product, it has the intention of the initial glycosylation product which has the carbonyl portion blocked by the reaction with this invention compound here. In a certain example, it is thought that an initial glycosylation product also includes condensation, dehydration and/, or the reconfigured product the reactant carbonyl portion of the AMADORI product which condenses and generates an altitude glycosylation end product, or after that. The reactant carbonyl compound (for example, glycolaldehyde, a glyceraldehyde, or 3-deoxy glucosone) which contains a kind or several sorts of carbonyl portions in another example is the cleavage (cleavage) of an AMADORI product or other initial glycosylation products. It is generated (for example, refer to Adv.Food Res. and 14,167-283 pages in In The Glycoproteins, Part A, 141-157 pages, Elsevier Publishing Co., New York; Reynolds, T.M. and 1965 in Gottschalk, A. and 1972), and carbonyl content altitude glycosylation products, such as an alkyl formyl-glycosyl pyrrole (previous statement) which is subsequently indicated by Farmar etc. by the reaction with an amine or an AMADORI product, are generated.

[0034] That researcher studied how many generation mechanisms of an altitude glycosylation product. It is said that the cross linkage of "Nonenzymatic Glucosylation and Glucose-dependent Cross-linking of Protein" and J.Biol.Chem. which are research in a test tube of Eble others, 258, and the 9406-9412 pages of the glycosylation protein is carried out to non-glycosylating protein under the conditions in which a glucose does not exist. The initial glycosylation trial to which it meant that Eble etc. solved the mechanism of a Maillard reaction, therefore RNA ase



was adjusted as a model system was performed, and this was carried out under various conditions. On an certain aspect of affairs, glycosylation protein was separated, and since it was put on the bottom of environment without a glucose, the degree of a cross linkage was observable.

[0035] It observed that a cross linkage did not arise only in glycosylation protein, but Eble etc. produced non-glycosylating protein similarly by that cause. One of the views observed by them is that the reaction of glycosylation protein and a protein material seemed to be generated in the location of the protein chain of an amino acid lysine. The result of the identification test performed by them showed that an isolation lysine was equal to the lysine on RNA ase for association of glycosylation protein. From these data, it is guessed that a lysine may carry out the role of the inhibitor of altitude glycosylation. However, the observation which became such a guess and its base must take into consideration that the model system which was prepared by them and inspected suited the context limited comparatively. Clearly, Eble etc. has not recognized the knowledge used as the base of this invention about controlling proteinic altitude glycosylation on the both sides in the living body within a test tube, and had not necessarily given suggestion, either.

[0036] The experiment of Eble others is not suggested about the reactant cleavage product mechanism of generation of the altitude glycosylation end product with which a glucose always exists in the living body. 1989 year (previous statement); Sell besides :, for example, HAYASE, which is supporting in fact this mechanism other researchers explain generation of an altitude glycosylation end product to be in the living body and Monnier, 1989 (previous statement); they are Agric.Biol.Chem. besides Oimomi, 53 (6), 1727-1728 pages, 1989, and Diabetes. Research and Clinical Practice, 6,311-313 pages, 1989. Using a lysine as an inhibitor in a model besides Eble in this way controls generation of an altitude glycosylation end product under the conditions to which a glucose exists in the living body, and it does not bring effect at all to the usefulness of this invention compound which brings about the improvement of diabetes mellitus or the complication by aging.

[0037] A useful compound contains the drugs which can react to the activity carbonyl intermediate field of an initial glycosylation product which is defined on these specifications by this invention. Suitable drugs are compounds indicated as a formula (I) in this specification.

[0038] This invention relates to the method of controlling generation of the altitude glycosylation end product which consists of contacting target protein to this invention constituent further. target protein — a vegetable property — be — animality — be — when contained in food, the constituent containing this invention drugs is applied to these food with the means of various common use.

[0039] Generally the sulfite is used for the food by which controlling a Maillard reaction is discovered, and it is processed and preserved on the food-stuff-industry community. However, it turning out that the asthmatic reaction to affect a life is caused recently depending on the case where the sulfite in food is severe, therefore performing sulfite processing to fresh vegetables or fruit came to be forbidden. The mechanism of an allergic response is not known. Therefore, this invention constituent and drugs can serve as a substitute without the toxicity of the sulfite for such food processing.

[0040] this invention method and a constituent control aging of the target protein of both an animal and vegetation, and bring profits economical as the result, and medical to coincidence so that clearly from the explanation about the background of this invention. In the case of food, shall delay food deterioration, a shelf life shall be made to extend by that cause, and it shall be easy to treat by the consumer by applying this invention constituent. This invention is very useful also at the point that the compound without this toxicity which has compatibility biologically can be substituted for the preservative used now [, such as sulfur dioxide with which making human being start allergy and asthma is known, ].

[0041] The process which ages by the proteinic altitude glycosylation and the proteinic cross linkage which serve as a key as it already said that this invention is seen in thrapeutics is controlled. Therefore, body protein especially body configuration protein, for example, a collagen, an elastin, lens protein, nerve protein, and the body material outside a kidney filament substrate film and other vessels will receive profits in respect of the life and a function by operation of this invention. This invention decreases the appearance of the various condition of disease by target protein, such as a retinopathy, a cataract, glycosuria angiopathy, the glomerulosclerosis, a peripheral vascular disease, the arteriosclerosis obliterans, a peripheral nerve disease, apoplexy, hypertension, arteriosclerosis, an osteoarthropathy, peripheral vessel hardening, elastic decline of the skin and wrinkling formation, arthrosclerosis, and glomerulonephritis, catching other protein by the cross linkage in this way. All the condition of disease mentioned above may be discovered to a diabetic. The therapy method by this invention is related to the therapy of the patient who shows above-mentioned condition of disease, or a quantity \*\* person.

[0042] By the cross linkage of the protein by altitude glycosylation product generation, the melting nature of structural protein, such as a collagen in a blood vessel wall, decreases (Science besides Brownlee, 232, 1629-1632 pages, 1986), and uptake of the serum proteins, such as lipoprotein to a collagen, is carried out. This increases the permeability of an inner bark, therefore carries out the result of the situations, such as share uptake of the extravasation plasma protein in the quality of an inner bark. It is thought for these reasons that advance-lock out of the glycosuria blood vessel raised by chronic hyperglycemia is as a result of too much generation of the cross linkage originating in a glucose. Such diabetic large artery change and small vascular occlusion can be effectively prevented by controlling altitude glycosylation product generation chemically using this invention constituent and a method.

[0043] or [ that advance of the chronic diabetes-mellitus failure in a target organ is fundamentally connected with

hyperglycemia, therefore a peripheral organic failure can be delayed by severe metabolic turnover control as a result of research ] — or it turned out that it can prevent. Lab. Invest. besides Nicholls, 60, No. 4, 486 page, 1989, reference; this is discussing the effect of the aminoguanidine in glycosuria \*\*\*\*\* of a rat. Aminoguanidine checked reducing the protein cross linkage of the main artery wall of a glycosuria rat, and these researches have corroborated the previous research on this additional target organ concerning diabetes mellitus (Science besides Brownlee, 232, 1629–1632 pages, 1986). Moreover, another research has reported that immuno guanidine prehension of the kidney decreases by aminoguanidine (Diabetes besides Brownlee, 35, Suppl. 1, 42A, 1986).

[0044] Aminoguanidine administration is reported about the morphologic change whose advance of diabetic kidney disease is the certification of the diabetic—in another proof about aminoguanidine administration interfering kidney disease using a streptozotocin–glycosuria rat model (1988 besides Brownlee, previous statement). These researchers have reported what the condition that the thickness of the filament substrate film which is the main morphologic abnormality of diabetic kidney disease increased was inhibited for by aminoguanidine.

[0045] If these are considered and united, even if it is the early stages of the morphological lesion which originates in diabetes mellitus by controlling generation of an altitude glycosylation end product (AGE) by instruction of this invention, or an anaphase, it can say with being suggested strongly that these data can control also about aging by generation of AGE.

[0046] Deformation (this stiffens a cell membrane further) of the erythroid cell by diabetes mellitus is another proof of a cross linkage arising, and it turned out that aminoguanidine inhibits this in the living body. In such research, in order to investigate the effect of a trial compound exerted on deformation (df) of an erythroid cell (RBC), the white rabbit from New Zealand which suffers from diabetes mellitus for a long period of time was used. The trial compound was administered orally at a rate of 100 mg/kg to the glycosuria rabbit (Presentation of Abstract for Association for Academic Minority Physicians besides Brown, Annual Scientific Meeting, 1989).

[0047] It turned out that the increment in the cross linkage of the collagen in a glycosuria rat is inhibited by aminoguanidine. Oxlund and Andreassen — “the increase of the biochemical and living thing scientific stability of a collagen in a glycosuria rat is inhibited by the aminoguanidine therapy”, and European Association for the Study of Diabetes, a 25 times annual meeting, 525A page, and Abstract In 371 or No. 1989, the effect of the thermal stability of tendon cells being measured by the crushing time amount in an urea bath, and a mechanical strength also being measured is described. “an albumin urea not being reduced although aminoguanidine reduces the fluorescence of the organization of a diabetes–mellitus rat”, and NIH Conference on the Maillard Reaction in Aging and Diabetes and The same effect is accepted as a result of measuring fluorescence and solubility about the collagen of 22–23, 30 pages, and \*\*\*\*\* in Nutrition, Bethesda, Maryland, and September, 1988. [ of Soulis others ]

[0048] Diabetes, 38, and supplement “, as for an aminoguanidine therapy, the stable state level on which mRNA of the laminin B1 in the kidney of a streptozotocin glycosuria rat increased over a long period of time is normalized” What the increment in which the aminoguanidine therapy to \*\* and a diabetes–mellitus rat originates in the diabetes mellitus of mRNA of the laminin B1 in the kidney will be inhibited for in 2, A pages and the 49th time annual meeting of 83 U.S. diabetes–mellitus societies, and 1989 is shown. [ of Giambione and Brownlee ] Aminoguanidine inhibits excessive growth of a substrate and this shows the gestalt thing [ the blood circulatory system in the tylosis of a filament film, and the organ of the kidney and others ] by that cause for which functional deterioration is prevented.

[0049] Another result of diabetes mellitus is substrate bone differentiation originating in hyperglycemia leading to the osteogenesis decline usually connected with chronic diabetes mellitus. In the animal model, diabetes mellitus decreased substrate bone differentiation 70% (Am. J. Phys., 1980 [ 238 or ]).

[0050] this invention constituent — in the living body — or when used for the purpose of a therapy, the compound or drugs used should be noticed about having biological adaptability. In addition, a medicine manufacture constituent is prepared with the therapeutic–effective dose of this invention drugs or a compound if needed in the support which was chosen from known material which agrees for the purpose and which is accepted pharmacologically. Such a constituent is prepared with various gestalten according to a medication method. Moreover, various addition salts of a formula (I) accepted pharmacologically may be used.

[0051] The liquid–like thing will be used when administration is performed by an intravenous injection, an intramuscular injection, or intraperitoneal injection. In a suitable case, a solution, the suspension of a solid object, for example, a tablet, and a capsule, etc. may be liquid because of internal use. With \*\*\*\* (vehicle) suitable for local application of the skin, an eye, etc., for example, water, ethanol, propylene glycol, etc., the support for carrying out penetration to the skin or an eye is added, and it prepares in forms, such as a solution, a lotion, or an ointment. For example, a certain dispensing for parts contains the compound of a formula (I) to about 10%. Another, suitable administration object may be considered for other body tissues.

[0052] A therapy animal is medicated with a kind or several sorts of drugs when this invention method is enforced for a therapy. administration — the method of common use — for example, other means perform taking–orally–local, parenteral, for example, intradermal injection, subcutaneous injection, an intravenous injection, intraperitoneal injection, etc. Medication may be performed by the rear spring supporter, for example, the level of about 25 mg/kg, at a long period of time.

[0053] As stated previously, this invention is concerned also with the discoloration suppression method of the gear tooth by the nonenzymatic bronzing in the oral cavity, and this method includes sufficient thing to do for amount administration to the object which needs such a therapy, in order to control altitude glycosylation end product generation for the constituent containing the drugs of a formula (I).

[0054] Dental discoloration arises by the nonenzymatic bronzing reaction produced within the oral cavity. The anti-dental plaque (I will spread) agent by which current use is carried out promotes this nonenzymatic bronzing reaction, and accelerates dental discoloration dirt. The cation system germicide which has the remarkable anti-dental plaque effect recently is prepared as an object for an opening rinse for sterilization in the oral cavity. As these drugs for sterilization, alexidine, cetylpyridinium chloride, chlorohexidine gluconate, HEKISE tee gin, benzalkonium chloride, etc. are raised.

[0055] It is clear that discoloration dirt's of the gear tooth by the anti-dental plaque agent of chloro HEKISHIJIN and others it is what is depended on a Maillard reaction. Nordbo has reported that chlorhexidine and benzalkonium chloride carry out the catalysis of a bronzing reaction in the living body in J.Dent.Res., 58 or 1429 pages, and 1979. Chloro HEKISHIJIN added by mixture including a sugar derivative and the source of the amino group increases a pigmentation operation, and causes a Maillard reaction. Moreover, use of chloro HEKISHIJIN brings about the result which increases the thin film produced for a gear tooth. Nordbo has reported that chloro HEKISHIJIN invites dental discoloration dirt in the following two modes. One of them is increasing generation of the thin film containing many amino groups, and another is becoming the catalyst of the Maillard reaction which generates a discoloration product.

[0056] According to this invention method, the compound of a formula (I) is prepared with the constituent suitable for using it into the oral cavity. Especially a suitable formula is the oral cavity rinse agent and toothbrushing paste which mixed activity drugs.

[0057] In operation of this invention, in order to prepare an oral cavity rinse agent and a toothbrushing paste, it prepares by the method of common use using the nontoxic support of the amount and presentation which were known well accepted pharmacologically.

[0058] The drugs of a formula (I) prepare an effective amount in the form of a constituent, in order to control generation of an altitude glycosylation end product. Although this amount changes with administration gestalten with the drugs used, of course again, they are 0.01 of an administration object thru/or 1.0 % of the weight typically.

[0059] Moreover, the drugs in the above-mentioned method are condensed by taking-orally-or parenteral administration by salivary glands. Drugs are made into the taking orally parenteral administration gestalt of common use for such administration. Especially a desirable administration gestalt is that mix drugs into a vitamin tablet or a fluoride tablet, and the consent of a patient, especially a small-child patient is obtained to the maximum extent.

[0060] As for the compound contained in a formula (I), it is desirable to prepare by the chemosynthesis method well learned by this contractor. The thing with the compound contained in a formula (I) can be easily prepared by being able to obtain easily from a chemical supply company, or writing a prescription especially. For example, the following compounds are Aldrich. Chemical Company (U.S. Wisconsin —): propane diamide (chestnut amide); cyanoacetic-acid hydrazide which may come to hand from Milwaukee 3-amino-3-imino propane amide (cyano aceto hydrazide —) Mono-hydrochloride (chestnut AMAMIJIN HCL); SHIASETO amide; Methyl sulfonyl acetonitrile; the 2 and 2-dimethyl -1, the 3-dioxane -4, and 6-Dion (isopropylidene malonate); The 5 and 5-dimethyl -1 and 3-cyclohexane Dion (dimedone); cyanoacetamide; — cyano acetyl urea; aceto acetyl glycine; Malonic-acid dihydrazide; 2, 4-2,4-pentanedione; 3-oxo-butaneamide; malonic acid; And malonic-acid monomethyl potassium (potassium salt of malonic-acid monomethyl ester).

[0061] As other compounds which are contained in a formula (I) and indicated by chemistry or patent reference, :cyanoacetic acid to which a compound as shown below is raised; methane sulfonyl acetone; Methane sulfonyl acetamide; Diethyl malonate; Dimethyl malonate; Ethyl methane sulfonyl acetate; MARONO nitril; Methyl 4 and 4-dimethyl-3-oxo-pentanoate; 4 and 4-dimethyl-3-oxo-pen TANONI tolyl; N-methyl aceto acetamide; Malonic-acid monoethyl hydrogen; 1, 3-cyclohexane Dion; 1, and 3-cyclopentane Dion; A tetrahydrofuran -2 and 4-Dion (tetronic acid); 2 and 4-pyrrolidine Dion (tetramine acid); the 1-methyl -2 and 4-pyrrolidine Dion (J.Am.Chem.Soc. besides Lee, and 100 — 4225-4236 pages) 1978; And 5-sec-butyl -2, 4-pyrrolidine Dion (Biochem.J. besides Stickings, 78,412-418 pages, 1961).

[0062]

[Example] This invention will be more deeply understood by referring to the following examples.

[0063] The method below <Example 1> is enforced so that capacity evaluation of this invention compound used in order to control the growth through a medium of a glucose of the bovine-serum-albumin (BSA) fluorescence which is the scale of a cross linkage may be performed. It was kept warm by the concentration which melted the glucose of 400mM(s), and 100mg [/ml] BSA in the acid sodium buffer solution (pH7.4) which does not get a compound 1.5M under a sterile condition.

[0064] The sample of incubation mixture was taken out after one-week incubation for fluorometry. Only the compound considered the example incubation object of a comparison in the buffer solution as (C), a compound plus glucose (G+C), and the compound plus BSA (B+C) about each trial compound. The additional group of the incubation object of a glucose and BSA (B+G) was prepared as an example of a criteria comparison, and the depressor effect of a compound was measured to this. The incubation object was made three kinds, respectively.

[0065] After diluting with a diluent 100 times about a sample, respectively, fluorescence (excitation, 370nm; radiation, 440nm) was measured.

[0066] Bronzing control % of each trial compound was calculated as follows. Each F shows the fluorescence value after the one-week incubation which reduced the fluorescence value before incubation.

[Equation 1]

$$\frac{F_{B+G} - [F_{B+G+C} - (F_C + F_{G+C} + F_{B+C})]}{F_{B+G}} \times 100$$

For the inside B of a formula, a glucose and C of BSA and G are trial compounds.

[0067] The bronzing control % of various trial compounds (1mM) is as follows.

0% With no inhibitor;

56.9% Propane diamide (chestnut amide);

51.9% 3-amino-3-imino propane AMIDOMONO hydrochloride (chestnut AMAMIJIN HCL);

51.9% Cyanoacetic-acid hydrazide (cyano aceto hydrazide, SHIASETO amide);

35.8% Methyl sulfonyl acetonitrile;

24.1% The 2 and 2-dimethyl -1, the 3-dioxane -4, 6-dione (isopropylidene malonate; mel drum acid);

47.1% The 5 and 5-dimethyl -1, 3-cyclohexanedione (JIMEJION);

35.1% The aceto acetyl glycine;

69.9% Malonic-acid dihydrazide;

51.6% 2, 4-pentane Dion;

33.2% 3-oxo-butaneamide;

40.6% Malonic acid;

35.8% Malonic-acid monomethyl potassium (potassium salt of malonic-acid monomethyl ester).

[0068] The above-mentioned experiment has suggested what the therapy using these drugs probably has an effect for in order to reduce the lesion connected with formation of proteinic altitude glycosylation and the cross linkage of protein and other macromolecules. It is generated with diabetes mellitus or aging, and this drugs therapy may be adopted in order to inhibit the proteinic prehension and the increase of a cross linkage which produce complications, such as abnormalities of the abnormalities in a retina, a vascular disease, a tendon, and another ligament and joint portion. This cure can delay the atherosclerosis and connective tissue disorder which are produced with diabetes mellitus and aging again. Local and a taking orally parenteral administration gestalt can be considered.

[0069] <Example 2> lock Agent It is the compound of a formula (I) per mg/tablet. 50 starches 50 mannitol 75 magnesium stearates 2 stearin acid 2 [0070] This compound, starch, and RAKUTOZU were mixed and humid granulation was carried out at the starch pace. The humid granular object was placed on the tray and it dried at the temperature of 45 degrees C overnight. The crusher ground the desiccation grain and it considered as the particle size of about 20 meshes. These were added to said desiccation grain by making magnesium stearate, stearin acid, and the remainder into starch, and it mixed, before compressing with a suitable tablet formation press. Subsequently, it compressed into the tablet with a weight of 232mg using the 11/32" punch which has the hardness of 4kg. These tablets are disassembled by half-time amount by the method indicated by USP XVI.

[0071] <Example 3> Lotion mg/g Compound of a formula (I) 1.0 Ethyl alcohol 400.0 Polyethylene glycol 400 300.0 Hydroxypropyl cellulose 5.0 Propylene glycol The whole is set to 1.0g.

[0072] Compound of a <Example 4> opening rinse agent type (I) 1.4 % chlorhexidine glyconate 0.12 % ethanol 11.6 % sodium saccharin 0.15 % FD&C Blue No.1 0.001% peppermint oil 0.5 % glycerol 10.0 % Tween 60 0.3 % water In addition, it may be 100%.

[0073] <Example 5> Dentifrice paste The compound of a formula (I) 5.5% 70% aqueous solution of a sorbitol 25 % sodium saccharin 0.15% Sodium lauryl sulfate 1.75% Carbopol 934, 6% dispersion liquid of water 15 % spearmint oil 1.0% 50% aqueous solution of a sodium hydroxide 0.76% 2 base calcium phosphate JIHIDO rate 45 % water In addition, it may be 100%.

[0074] In order to investigate further the capacity of a nonenzymatic bronzing retardant to prevent the protein discoloration on the surface which is produced on the surface of the <Example 6> gear tooth, the following surface bronzing experiments were conducted. The protein fixed surface (gelatin content, i.e., a collagen) was formed on paper using the photograph paper developed as an alternative of the surface of the gear tooth covered by the thin film, without being exposed. The disk which punched the 5-millimeter circle, prepared the solution which melted the glucose-6-phosphate of 100mM into pH 7.4 containing the sodium azide of 3mM and the acid chloride buffer solution which does not get 0.5M, punched, and was obtained was immersed for one week into this solution.

Glucose-6-phosphate is sugar which produces nonenzymatic bronzing earlier than a glucose. The example at the time of adding the compound of chlorhexidine and/or a formula (I) other than glucose-6-phosphate was also acquired. After incubation, it is water, this gelatin / paper disk were rinsed, brown was observed, and it took in the photograph.

[0075] Compared with the disk with which the disk which kept it warm only by glucose-6-phosphate was immersed only in the buffer solution, brown was seen slightly. Remarkable bronzing was shown when chlorhexidine (a brand name Peridex, last concentration: 0.04% chlorhexidine) was made to contain. When the compound of a formula (I) was added to chlorhexidine, bronzing of gelatin content was completely inhibited like the case where the compound of a formula (I) is added, without adding chlorhexidine.

[0076] That the slight brown formed in the gelatin content surface only of the operation of a glucose-6-phosphoric acid salt can be prevented with the compound of a formula (I) proves the usefulness of this invention for preventing the nonenzymatic bronzing on the surface of a gear tooth. That the remarkable bronzing by existence of chlorhexidine can be prevented with the compound of a formula (I) shows that this invention inhibitor can prevent effectively the non-oxygen-bronzing promoted by the anti-dental plaque agent produced with chlorhexidine.

[0077] This invention can be realized with other gestalten, without deviating from the range. It should be understood that modification of the example of this invention which should be understood that this specification is for following, not limiting this invention and explaining, and is in an equal range is included in this invention.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 3 1 0 5 6 5

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 11 月 22 日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A61K 31/16	ABN	8413-4C		
	ADD	8413-4C		
31/19	ABL	8413-4C		
	ABX	8413-4C		
	ADN	8413-4C		
審査請求 未請求 請求項の数 43 (全 12 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平 3 - 2 2 8 2 0 5  
(22) 出願日 平成 3 年 (1991) 4 月 3 日  
(31) 優先権主張番号 5 0 3, 8 0 4  
(32) 優先日 1990 年 4 月 3 日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 5 9 1 1 9 7 3 3 4  
ザ ロックフェラー ユニバーシティ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1002  
1-6399 ニューヨーク ヨーク アヴ  
ェニュー 1230  
(72) 発明者 ピーター シー ウルリヒ  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0  
7675 オールド タッパン デ ウォ  
ルフ ロード 148  
(72) 発明者 アンソニー セラミ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 109  
77 シェルター アイランド ラム ア  
イランド ドライブ (番地なし)  
(74) 代理人 弁理士 早川 政名

(54) 【発明の名称】 蛋白質の高度グリコシル化抑制組成物及び抑制方法

(57) 【要約】

【目的】 非酵素的交叉結合 (蛋白質老化) を抑制する組成物及び方法を提供する。食品劣化及び動物蛋白質劣化に対する工業用及び治療用に利用できる。

【構成】 標的蛋白質の初期グリコシル化により生ずる初期グリコシル化産物カルボニル部分と反応させることにより、当該蛋白質の高度グリコシル化最終産物の生成を抑制する薬剤を含む組成物、及び標的蛋白質をこの組成物と接触させることを含む方法が開示される。

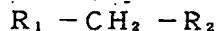
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的蛋白質の高度グリコシル化を抑制



(式中、 $R_1$  は-CN, 又は-CO- $R_3$ ;  $R_3$  は $R_1$ , -OH, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -NHR;  $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に-SO<sub>2</sub>- $R_1$ , -CNH-NH<sub>2</sub>, 又は-CO-NHCH<sub>2</sub>-COOH;

$R$ は低級アルキル基、但し $R_1$ と $R_2$ は別々に-CO- $R_3$ から選ばれ、 $R_3$ は $R_1$ , -OR又は-NHRである場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造を形成する1~5個の炭素原子のアルカンジール架橋で



(式中、 $R_1$  は-CN, 又は-CO- $R_3$ ;  $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に-SO<sub>2</sub>- $R_1$ , -CNH-NH<sub>2</sub>, 又は-CO-NHCH<sub>2</sub>-COOH;  $R$ は低級アルキル基;  $R_3$ は $R_1$ , -OH, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -NHR、但し $R_1$ と $R_2$ は別々に-CO- $R_3$ から選ばれ、 $R_3$ は $R_1$ , -OR又は-NHRである場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造を形成する1~5個の炭素原子のアルカンジール架橋であってよい)、で表わされる化合物; それらの製薬学的に受入れられる酸付加物; 及びそれらの混合物; のうちから選ばれた製薬学的に有効量の化合物と、その製薬学的に受入れられる担体、とからなる製薬組成物。

【請求項3】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$ がシアノ基であり、 $R_3$ が-SO<sub>2</sub>- $R_1$ , -CO-NH<sub>2</sub>, -CO-NHNH<sub>2</sub>, 又は-CO-NHCO-NH<sub>2</sub>基である請求項1又は2記載の組成物。

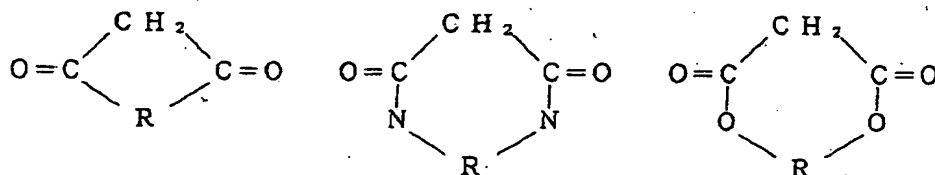
【請求項4】 前記化合物がメチルスルホニルアセトニトリルである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項5】 前記化合物がシアノアセトアミドである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項6】 前記化合物がシアノ酢酸ヒドラジドである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項7】 前記化合物がシアノアセチルウレアである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項8】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$ が-CO- $R_3$ であり、 $R_3$ がアミノ基であり、 $R_2$ が $R_1$ と同じ基又は-CNHNH<sub>2</sub>基である請求項1又は2記載の組成物。



【請求項18】  $R$ が1~5個の炭素原子を含む請求項17記載の組成物。

【請求項19】 前記化合物が5, 5-ジメチル-1, 3-シクロヘキサジエンである請求項1又は2

する組成物であって、下記式

(I)

あってもよい)、で表わされる化合物; それらの製薬学的に適合性のある酸付加物; 及びそれらの混合物; のうちから選ばれた製薬学的に有効量の化合物と、その担体とからなる蛋白質の高度グリコシル化抑制組成物。

【請求項2】 動物における標的蛋白質の高度グリコシル化を抑制するため当該動物に投与する製薬組成物であって、下記式

(I)

【請求項9】 前記化合物がプロパンジアミドである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項10】 前記化合物が3-アミノ-3-イミノプロパンアミドモノヒドロクロリドである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項11】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$ が-CO- $R_3$ 基であり、 $R_3$ がヒドロキシアミノ基であり、 $R_2$ が $R_1$ と同じ基又は-CO-OR基である請求項1又は2記載の組成物。

【請求項12】 前記化合物がマロン酸である請求項1又は2記載の組成物。

【請求項13】 前記化合物がマロン酸モノメチルカリウムである請求項1又は2記載の組成物。

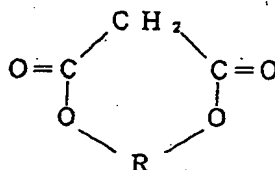
【請求項14】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$ が-CO- $R_3$ 基であり、 $R_3$ が $R_1$ ,  $R_2$ が $R_1$ と同じ又は-CO-NH-CH<sub>2</sub>-COOH基である請求項1又は2記載の組成物。

【請求項15】 前記化合物が2, 4-ペンタンジオンである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項16】 前記化合物がアセトアセチルグリシンである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項17】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$ が-CO- $R_3$ 基であり、 $R_3$ が-R, -NHR又は-OR基であり、 $R_2$ は $R_1$ と同じであり、 $R$ のアルキル基が下記式の化合物を形成する分子の二つの員環の間のアルカンジール架橋をなす請求項1又は2記載の組成物。

【化1】



記載の組成物。

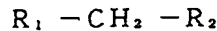
【請求項20】 前記化合物がマロン酸ジヒドラジドである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項21】 前記化合物がメチルスルホニルアセ

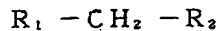
3

トニトリルである請求項1又は2記載の組成物。

【請求項22】 標的蛋白質の高度グリコシル化を抑



(式中、 $R_1$  は $-CN$ 、又は $-CO-R_3$ ； $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に $-SO_2R$ 、 $-CNH-NH_2$ 、又は $-CO-NHCH_2-COOH$ ； $R$  は低級アルキル基； $R_3$  は $R$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-NHR$ 、但し $R_1$  と $R_2$  は別々に $-CO-R_3$  から選ばれ、 $R_3$  は $R$ 、 $-OR$ 又は $-NHR$ である場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造を形成する1～5個の炭素原子のアルカンジイル架橋



(式中、 $R_1$  は $-CN$ 、又は $-CO-R_3$ ； $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に $-SO_2R$ 、 $-CNH-NH_2$ 、又は $-CO-NHCH_2-COOH$ ； $R$  は低級アルキル基； $R_3$  は $R$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-NHR$ 、但し $R_1$  と $R_2$  は別々に $-CO-R_3$  から選ばれ、式中 $R_3$  は $R$ 、 $-OR$ 又は $-NHR$ である場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造を形成する1～5個の炭素原子のアルカンジイル架橋であってもよい)、で表わされる化合物；それらの製薬学的に受入れられる酸付加塩；及びそれらの混合物；のうちから選ばれた化合物と、その製薬学的に受入れられる担体、とからなる製薬組成物の有効量を投与することからなる方法。

【請求項24】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$  がシアノ基であり、 $R_2$  が $-SO_2R$ 、 $-CO-NH_2$ 、 $-CO-NHNH_2$ 、又は $-CO-NHCO-NH_2$ 基である請求項23記載の方法。

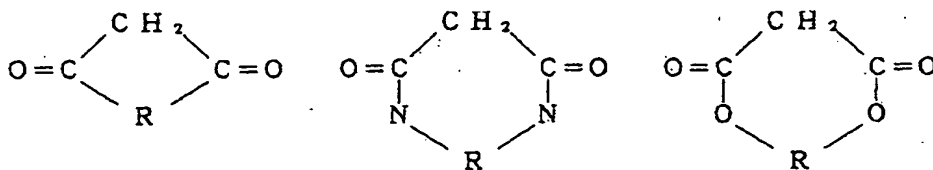
【請求項25】 前記化合物がメチルスルホニルアセトニトリルである請求項23記載の方法。

【請求項26】 前記化合物がシアノアセトアミドである請求項23記載の方法。

【請求項27】 前記化合物がシアノ酢酸ヒドラジドである請求項23記載の方法。

【請求項28】 前記化合物がシアノアセチルウレアである請求項23記載の方法。

【請求項29】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$  が $-CO-R_3$ であり、 $R_3$  がアミノ基であり、 $R_2$



【請求項39】  $R$  が2～5個の炭素原子を含む請求項23記載の方法。

【請求項40】 前記化合物が5, 5-ジメチル-1, 3-シクロヘキサジエンである請求項23記載の方法。

4

制する方法であって、下記式

(I)

であってもよい)、で表わされる化合物；それらの生物学的に受入れられる酸付加物；及びそれらの混合物；のうちから選ばれた化合物と、その担体とからなる有効量の組成物を標的蛋白質と接触させることを含む方法。

【請求項23】 動物における標的蛋白質の高度グリコシル化最終産物の生成を抑制するための、当該動物の治療方法であって、前記方法が下記式

(I)

が $R_1$  と同じ又は $-CNH-NH_2$ 基である請求項23記載の方法。

【請求項30】 前記化合物がプロパンジアミドである請求項23記載の方法。

【請求項31】 前記化合物が3-アミノ-3-イミノプロパンアミドモノヒドロクロリドである請求項23記載の方法。

【請求項32】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$  が $-CO-R_3$ であり、 $R_3$  がヒドロキシアミノ基であり、 $R_2$  が $R_1$  と同じ又は $-CO-OR$ 基である請求項23記載の方法。

【請求項33】 前記化合物がマロン酸である請求項23記載の方法。

【請求項34】 前記化合物がマロン酸モノメチルカリウムである請求項23記載の方法。

【請求項35】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$  が $-CO-R_3$ であり、 $R_3$  が $R$ であり、 $R_2$  が $R_1$  と同じ又は $-CO-NH-CH_2-COOH$ 基である請求項23記載の方法。

【請求項36】 前記化合物がアセトアセチルグリシンである請求項23記載の方法。

【請求項37】 前記化合物の式(I)において、 $R_1$  が $-CO-R_3$ 基であり、 $R_3$  が $-R$ 、 $-NHR$ 又は $-OR$ 基であり、 $R_2$  が $R_1$  と同じであり、 $R$ のアルキル基が下記式の化合物を形成する分子の二つの員環の間のアルカンジイル架橋をなす請求項23記載の組成物。

【化2】

【請求項41】 前記化合物がマロン酸ジヒドラジドである請求項1又は2記載の方法。

【請求項42】 前記化合物がメチルスルホニルアセトニトリルである請求項23記載の方法。

【請求項43】 口腔の非酵素的褐色化により生じる



歯の変色を抑制する方法であって、下記式



(式中、 $R_1$  は $-CN$ 、又は $-CO-R_3$ ； $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に $-SO_2R$ 、 $-CNH-NH_2$ 、又は $-CO-NHCH_2-COOH$ ； $R$  は低級アルキル基； $R_3$  は $R$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-NHR$ 、但し $R_1$  と $R_2$  は別々に $-CO-R_3$  から選ばれ、 $R_3$  は $R$ 、 $-OR$ 又は $-NHR$ である場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造を形成する1～5個の炭素原子のアルカンジール架橋であってよい)、で表わされる化合物；それらの製薬学的に受入れられる酸付加塩及びそれらの混合物；のうちから選ばれる化合物と、その製薬学的に受入れられる担体、とからなる組成物の、高度グリコシル化最終産物生成抑制のための有効量を投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、蛋白質がグルコース及びその他還元糖と反応することによる蛋白質劣化に関し、更に詳しくは、非酵素的グリコシル化蛋白質の反応及びそれによりしばしば生ずる高度グリコシル化最終産物及び交叉結合の抑制に関する。

【0002】

【発明の背景及び従来の技術】グルコースと蛋白質との反応は以前から知られている。最初の報告は、メイラードによる、1912年に食品の煮焼中に褐色色素があらわれることの報告である。メイラードは、グルコース或いはその他の還元糖がアミノ酸と反応して付加物を生成し、これが一連の脱水反応及び再構成反応を行い安定した褐色色素を生成することを観察した(メイラード、C. R. Acad. Sci., 154, 66-68ページ、1912年)。より詳しい研究の結果、保蔵され熱処理を加えられた食品は、グルコースとポリペプチド鎖との反応により非酵素的に褐色化し、蛋白質はその結果として、交叉結合しそれに対応して生物学的利用性が減ずることがわかった。

【0003】還元糖と食品蛋白質とのこの反応は、生体内でも相似的に生じることが解った。かくしてアマドリ産物(Amadori product)として知られるグルコースと蛋白質の遊離アミノ基とが非酵素的に反応して生ずる安定した1-デオキシケトシル付加物が、ヘモグロビンと共に生じる。この場合、グルコースとヘモグロビンのベータ鎖のアミノ末端基との反応による再構成により、ヘモグロビン $A_{1c}$ として知られる付加物が生成される。この反応はまた種々の身体蛋白質、例えばレンズ結晶体、コラーゲン、神経蛋白質とも生ずることが解った(Bunnほか、Biochem. Biophys. Res. Comm., 67, 103-109頁、1975年；Koenigほか、J. Biol. Chem., 252, 2992-2997頁、1977年；

(1)

Monnierほか、Maillard Reaction in Food and Nutrition, 編者Waller, G. A., American Chemical Society, 215, 431-448頁、1983年；及びMonnier, Ceramides, Clinics in Endocrinology and Metabolism, 11, 431-452頁、1982年、参照)。

【0004】更に、後段階におけるメイラード産物とスベクトル特性、蛍光特性が類似する褐色色素もまた、幾つかの種類の長寿命蛋白質、例えば老人のレンズ蛋白質やコラーゲン等の生体内に観察された。色素の加齢による直線的な増加は、20才から90才の年令の人間の硬膜コラーゲンで観察されている(Monnierほか、Science, 211, 491-493頁、1981年；Monnierほか、Biochem. Biophys. Acta, 760, 97-103頁、1983年；Monnierほか、Proc. Nat. Acad. Sci., 81, 583-587頁、1984年)。

【0005】興味深いことにコラーゲンの老化は、試験管内で、グルコースにより引き起される交叉結合により模倣することができる。またその他の蛋白質や、コラーゲンによる付加生成物の捕捉は、交叉結合反応によることが理論化され、腎臓基礎膜中にアルブミンや抗体が蓄積する事態を説明しうる、と考えられている(J. Exp. Med., 158, 1739-1744頁、1983年；Kohnほか、Diabetes, 33, No. 1, 57-59頁、1984年)。

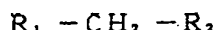
【0006】本出願の親出願である米国特許出願第798,032号において、高度グリコシル化最終産物の生成を抑制するための、標的蛋白質とグルコースの間の最初の反応により生ずる初期グリコシル化産物と反応させることによる方法及び試薬、が開示されている。これによれば、抑制剤と初期グリコシル化産物との間の反応が生じ、それにより交叉結合による後段階産物を生成するためのグリコシル化蛋白質と補足的な蛋白材料との、引きつづく反応が阻害され、かくして抑制が行われることが示される。ここで抑制剤として提示される薬剤の一つはアミノグアニジンであり、その試験結果はその有用性が確められている。

【0007】

【解決すべき問題点】アミノグアニジン及び類似化合物について良好な結果が約束されているけれども、利用性及び作用性を拡大すべく、また診断及び治療上の便宜を向上させるべく、更に抑制剤を確定し開発する必要性が感じられている。

【0008】

【本発明の要約】本発明によれば、蛋白質の高度グリコシル化（蛋白質の老化）を抑制するための方法及び組成物が開示される。特に本発明組成物は、高度グリコシル化最終産物の生成による非酵素的交叉結合（蛋白質の老化）を抑制するための薬剤を含む。この薬剤は、蛋白質とグルコースの反応による新陳代謝副産物を含む、初期



（式中、 $R_1$  は $-CN$ 、又は $-CO-R_3$ ； $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に $-SO_2R$ 、 $-CNH-NH_2$ 、或いは $-CO-NHCH_2-COOH$ ； $R$  は低級アルキル基； $R_3$  は $R$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-NHR$ 、但し $R_1$  と $R_2$  は別々に $-CO-R_3$  から選ばれ、 $R_3$  は $R$ 、 $-OR$ 又は $-NHR$ である場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造を形成する1-5個の炭素原子のアルカンジール架橋であってよい）、で表わされる化合物；その製薬学的に受入れられる酸付加塩；のうちから選ばれる化合物と、その担体とからなる。

【0010】本発明組成物に使用される上記化合物は、初期グリコシル化産物と反応するようであり、それにより、蛋白質の交叉結合及びその結果として蛋白質の老化を導く高度グリコシル化最終産物の生成を防止する。

【0011】本発明はまた蛋白質の老化を抑制する方法に関わり、この方法は、初期グリコシル化産物が存在する時点で、初期グリコシル化蛋白質を一定量の、一種又は数種の本発明薬剤と接触させることからなる。本発明方法が工業的に利用される場合、一種又は数種の本発明薬剤が当該標的蛋白質に適用されるのであるが、この際、蛋白質抽出物の場合にはその混合物中へ導入するか、また蛋白質を含む食品の場合にはその中に適用或いは導入するようにし、かくしていずれにせよ特定食品の早期老化或いは劣化を防止するようにする。

【0012】高度グリコシル化最終産物の生成を抑制するこの能力は、蛋白質劣化が重大な障害となるあらゆる用途で、大きな価値がある。例えば食品工業の分野で、食品劣化を遅延させることは、食品をより安定なものとして消費者により利用しやすいものとするために、顕著な経済的、社会的有用性をもたらす。食品劣化が減少するならば、食品の検査、除去、移動の費用や食品の扱いやすさや変わる場合と同様に、市場においてその価格を安定させることができよう。同様に、蛋白質のこわれやすさや問題になっている他の工業分野においても、本発明薬剤を、蛋白質を含有する組成物中に混入させることにより、その有用性を一層高めることができよう。今日使用されている食品保存剤や変色防止剤、例えばアレルギーや喘息などの生じさせる毒性を有することが知られている二酸化イオウ、などは、本明細書中に記載されているような化合物で代替されることになろう。

【0013】本発明方法は、メイラード反応が特に鋭く作用する身体内の蛋白質部分、なかでも、コラーゲン、

グリコシル化産物と反応することのできる物質から選ばれ、それ以後の反応を阻止する。生体内、或いは食品中に存在し、リボース、ガラクトース及びフラクトースを含む他の反応性糖類、による交叉結合もまた、本発明による方法及び組成物により阻止することができる。

【0009】この薬剤は下記構造式（I）

（I）

エラスチン、レンズ蛋白質、及び腎臓糸状体基質膜について特に良好な治療効果がある。これらの蛋白質は年令と共に（従って蛋白質の老化なる用語を用いる）また糖尿病の結果、劣化する。従って、高度グリコシル化最終産物の生成を遅延させるか或いは実質的に抑制することは、糖尿病の治療になると共に、もちろん、動物の生活の質を改善し、また寿命を延ばすことになる。

【0014】本発明薬剤は人の外観及び衛生の分野でも有用である。なぜなら例えばクロルヘキシジンなどの抗菌剤であるカチオン系殺菌剤による歯の変色汚れを防止するからである。

【0015】かくして本発明の主たる目的は、高度グリコシル化最終産物の生成を抑制することにより、グルコースその他の反応性糖類と蛋白質との反応の最終的な結果として生ずる、蛋白質の高度の交叉結合を抑制する方法を提供することである。

【0016】本発明の別の目的は、上記方法であって、本明細書では広く初期グリコシル化産物と記載されている初期グリコシル化蛋白質或いはその副産物、との反応による方法を提供することである。

【0017】本発明の更に別の目的は、上記方法であって、前記高度グリコシル化最終産物を生成する初期グリコシル化産物の再構成及び交叉結合を阻害する方法を提供することである。

【0018】本発明の更に別の目的は、上記方法において、前記初期グリコシル化産物との反応に関与する能力のある薬剤を提供することである。

【0019】本発明の更に別の目的は、上記方法及び薬剤を用いて、蛋白質老化によりもたらされる障害を治療する方法を提供することである。

【0020】本発明の更に別の目的は、上記方法及び薬剤を用いて、歯の変色を抑制する方法を提供することである。

【0021】本発明の更に別の目的は、本発明薬剤を含んだ治療用組成物を提供することである。

【0022】本発明のその他の目的及び利益は、当業者には、以下の説明を読むことにより明らかになろう。

【0023】

【問題点を解決するための手段及び作用】本発明によれば、動物及び植物の双方に存在する種々の標的蛋白質中に高度グリコシル最終産物が生成することを抑制する、と考えられる薬剤、前記薬剤を含む製薬組成物、及び関係する方法、が開発された。特に、本発明によれば、下

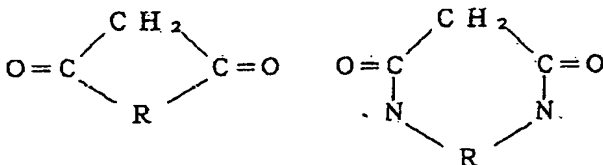
記構造式 (I) :



(式中、 $R_1$  は $-CN$ , 又は $-CO-R_3$ ;  $R_2$  は $R_1$  と同じ、又は補足的に $-SO_2R$ ,  $-CNH-NH_2$ 、もしくは $-CO-NHCH_2-COOH$ ;  $R$  は低級アルキル基;  $R_3$  は $R$ ,  $-OH$ ,  $-OR$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-NHR$ , 但し $R_1$  と $R_2$  は別々に $-CO-R_3$  から選ばれ、 $R_3$  は $R$ ,  $-OR$ 又は $-NHR$ である場合、低級アルキル部分は、分子を結合して環状構造とするようにする1~5個の炭素原子のアルカンジイル架橋であってよい)、で表わされる化合物; その製薬学的に受入れられる酸付加塩; のうちから選ばれる化合物と、その担体、とからなる一種乃至数種の薬剤を含む組成物、に関する。

【0024】ここで言及される低級アルキル及び低級アルコキシ基は、1乃至6個の炭素原子を有するものであって、メチル、メトキシ、エチル、エトキシ、プロピル、プロポキシ、ブチル、ブトキシ、ペンチル、ペンチロキシ、ヘキシル、ヘキシルオキシ基、及びこれらの有枝鎖異性体を含む。

【0025】式 (I) に含まれる化合物のうち、置換分のある組合せが好ましい。例えば、 $R_1$  がシアノ基 ( $CN$ ) である場合、 $R_2$  は好ましくは $-SO_2R$ ,  $-CO$



式において、 $R$  は好ましくは1~5個の炭素原子のアルカンジイル基であって、下記が含まれる: (イソプロリデン マロネート) 5, 5-ジメチル-1, 3-シクロヘキサジエン-2, 4-ジオン (ジメドン); 1, 3-シクロヘキサジエン-2, 4-ジオン (テトラヒドロフラン-2, 4-ジオン (テトラヒドロフラン酸)); 2, 4-ピロリジンジオン (テトラミン酸); 1-メチル-2, 4-ピロリジンジオン; 5-sec-ブチル-2, 4-ピロリジンジオン; シアノアセトアミド; N-メチルアセトアセトアミド; シアノアセチルウレア; アセトアセチルグリシン; マロン酸ジヒドラジド; 2, 4-ペンタンジオン (アセチルアセトン) 3-オキシブタンアミド; メチル4-4-ジメチル-3-オキシペンタノエート; マロン酸; モノメチルマロン酸カリウム (マロン酸モノメチルエステルカリウム塩); 及びマロン酸モノエチル水素。

【0031】上記化合物は、標的蛋白質について高度グリコシル化最終産物の生成を抑制することができる。高度グリコシル化最終産物を生成する蛋白質の交叉結合により、その他の蛋白質をとり込み、皮膚の弾性減少、し

(I)

$-NH_2$ ,  $-CO-NH-NH_2$ , 又は $-CO-NH-CO-NH_2$  基である。

【0026】 $R_1$  が $-CO-R_3$  であり、 $R_3$  がアミノ基である場合、 $R_2$  は好ましくは $-CO-NH_2$ , 又は $-CNH-NH_2$  基である。

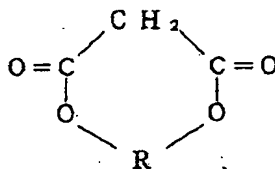
【0027】 $R_1$  が $-CO-R_3$  であって $R_3$  がヒドロキシ基である場合、 $R_2$  は好ましくは、 $-CNH-NH_2$  基である。

【0028】 $R_1$  が $-CO-R_3$  基であって、 $R_3$  がヒドロキシ基である場合、 $R_2$  は好ましくは、 $-CO-NH_2$  又は $-CO-OR$  基である。

【0029】 $R_1$  が $-CO-R_3$  基であって、 $R_3$  が $R$  である時、 $R_2$  は好ましくは $-CO-R$  基又は $-CO-NH-CH_2-COOH$  基である。

【0030】 $R_1$  が $-CO-R_3$  基で $R_3$  が $R$ ,  $-NHR$ 又は $OR$  基である場合、極めて好ましい基は、 $R_2$  が $R_1$  と同じであり、 $R$  のアルキル基が、分子の二つの側の間にアルカンジイル架橋を構成するものであって、即ち下記式の化合物。

【化3】



わの形成、ある種の腎臓病、アテローム性動脈硬化症、骨関節炎、等の生体内条件を招来する。同様に、植物においては、非酵素的褐色化により劣化し、食品では腐るか硬化し、従って食用に適さなくなる。それゆえに本発明により採用される化合物が、このような後期メイラード効果を抑制して、上述の劣化現象に干渉するのである。

【0032】本発明によれば、後期グリコシル化段階、即ちPongorほか (既述) やFarmanほか (既述) により報告されたような蛍光発色団の生成、特に糖尿病や老化による悪い状態をもたらすような発色団の生成をブロックする薬剤を使用する。ここで理想的な薬剤は、発色団の生成、蛋白質相互間の交叉結合、動脈硬化症や腎臓病にみられるような他の蛋白質に蛋白質が捕捉される状態などを防止する。

【0033】本発明の化合物が反応すると考えられる初期グリコシル化産物の化学的性質には色々あり、本明細書において使用される“初期グリコシル化産物”なる用語は、これらすべてを含む、と考えられるべきである。例えば、高度グリコシル化最終産物の生成に関係し、本発明化合物との反応によりブロックされるカルボニル部

分を有する初期グリコシル化産物が、ここで意図されている。ある例では、初期グリコシル化産物は、縮合して高度グリコシル化最終産物を生成するアマドリ産物の反応性カルボニル部分、或いはその後縮合、脱水及び／もしくは再構成された産物も含む、と考えられている。別の例では、一種又は数種のカルボニル部分を含む反応性カルボニル化合物（例えばグリコールアルデヒド、グリセルアルデヒド或いは3-デオキシグルコソソ）はアマドリ産物或いはその他の初期グリコシル化産物のへき開（cleavage）により生じ（例えば、Gottschalk, A, 1972年, In The Glycoproteins, Part A, 141~157 頁, Elsevier Publishing Co., New York; Reynolds, T. M, 1965年, Adv. Food Res., 14, 167~283 頁参照）、次いでアミン或いはアマドリ産物との反応により Farmer ほか（既述）により記載されているようなアルキルフォルミル-グリコシルピロールなどのカルボニル含有高度グリコシル化産物を生成する。

【0034】幾人かの研究者が高度グリコシル化産物の生成メカニズムを研究した。Eble ほかの試験管内研究である“Nonenzymatic Glucosylation and Glucose-dependent Cross-linking of Protein”, J. Biol. Chem., 258, 9406~9412 頁はグルコースが存在しない条件下で、グリコシル化蛋白質を非グリコシル化蛋白質と交叉結合させることを述べている。Eble ほかは、メイラード反応のメカニズムを解明することを意図し、そのためモデル系として RNA アーゼの、調整された初期グリコシル化試験を行い、これは様々の条件下で実施された。ある局面では、グリコシル化蛋白質が分離され、グルコースのない環境下に置かれたため、交叉結合の程度を観察することができた。

【0035】Eble ほかは、それにより、交叉結合がグリコシル化蛋白質にだけ生ずるのではなく、非グリコシル化蛋白質でも同様に生ずることを観察した。彼等に観察された所見の一つは、グリコシル化蛋白質と蛋白質材料との反応が、アミノ酸リシンの蛋白質鎖の位置で生じるように見えたことである。彼等により行われた確認試験の結果は、グリコシル化蛋白質の結合のためには、遊離リジンは RNA アーゼ上のリジンに匹敵することを示していた。これらのデータから、リジンは高度グリコシル化の抑制剤の役割をするかもしれないことが推測される。しかしこのような推測及びその基礎になった観察は、彼等により準備され検査されたモデル系が比較的限定された前後関係にあった、ということ考慮に入れなければならない。明らかに Eble ほかは、試験管内及び生体内の双方で蛋白質の高度グリコシル化を抑制する

ことに関する、本発明の基礎となる知見を認識しておらず、示唆も与えているわけではなかった。

【0036】Eble ほかの実験は、グルコースが常に存在する高度グリコシル化最終産物の生体内生成の反応性へき開産物メカニズムについて、示唆していない。実際には、他の研究者は、生体内で高度グリコシル化最終産物の生成を説明するこのメカニズムを支持している：例えばハヤセほか、1989年（既述）；Sell 及び Monnier、1989年（既述）；Oimomi ほか、Agric. Biol. Chem., 53 (6), 1727~1728 頁、1989年；及び Diabetes Research and Clinical Practice, 6, 311~313 頁、1989年。かくして Eble ほかのモデルにおいてリジンを抑制剤として使用することは、生体内にグルコースが存在する条件下で高度グリコシル化最終産物の生成を抑制し、糖尿病や老化による余病の改善をもたらす本発明化合物の有用性に何等影響をもたらすものではない。

【0037】本発明で有用な化合物は、本明細書で定義されるような初期グリコシル化産物の活性カルボニル中間体に反応することのできる薬剤を含む。適当な薬剤は、本明細書において式 (I) として記載されている化合物である。

【0038】本発明は、更に、標的蛋白質を本発明組成物と接触させることからなる、高度グリコシル化最終産物の生成を抑制する方法に関する。標的蛋白質が植物性であれ動物性であれ、食品中に含まれている場合、これら食品には、本発明薬剤を含有する組成物が種々の慣用の手段で適用される。

【0039】食品工業界で、亜硫酸塩はメイラード反応を抑制することが発見され、加工され保蔵される食品に一般的に使用されている。しかしながら最近、食品中の亜硫酸塩はひどい、場合によっては命にかかわる喘息反応をひき起こすことがわかり、そのため、生野菜や果物に亜硫酸塩処理を施すことは禁止されるようになった。アレルギー反応のメカニズムは知られていない。従って本発明組成物及び薬剤は、このような食品処理のための亜硫酸塩の、毒性のない代替品となりうる。

【0040】本発明の背景についての説明から明らかであるように、本発明方法及び組成物は、動物及び植物双方の標的蛋白質の老化を抑制し、同時にその結果として経済的、医学的な利益をもたらす。食品の場合、本発明組成物を適用することにより、食品劣化を遅延させ、それにより棚寿命を延長させ、消費者により扱いやすいものとする。人間にアレルギーや喘息を起させることが知られている二酸化イオウなどの現在使用されている保存剤を、この毒性のない、生物学的に融和性のある化合物で代替することができる点でも、本発明は極めて有用なものである。

【0041】本発明を治療学的にみると、既に述べたよ

うにキーとなる蛋白質の高度グリコシル化及び交叉結合により老化するプロセスを抑制する。従って身体蛋白質、特に身体構成蛋白質、例えばコラーゲン、エラスチン、レンズ蛋白質、神経蛋白質、腎臓糸状体基質膜その他脈管外体物質は、本発明の実施により、その寿命及び機能の点で利益を受けることになる。本発明はかくして、網膜症、白内障、糖尿病性血管病、糸球体硬化症、末梢性脈管病、閉塞性動脈硬化症、末梢神経病、卒中、高血圧症、動脈硬化症、骨関節症、末梢血管硬化、皮膚の弾性減退及びしわ形成、関節硬化、糸球体腎炎などの、標的蛋白質が交叉結合により他の蛋白質を捕捉することによる各種病状の出現を減少させる。上述した病状のすべては、糖尿病患者に発現しうる。本発明による治療方法は、上述の病状を示す患者或いは高令者の治療に関係する。

【0042】高度グリコシル化産物生成による蛋白質の交叉結合により、血管壁におけるコラーゲンなどの構造蛋白質の溶解性が減じ (Brownlee ほか、Science, 232, 1629~1632 頁、1986 年)、またコラーゲンに対するリボプロテインなどの血清蛋白質を捕集する。このことは内皮の透過性を増大させ、従って内皮質における溢出プラズマ蛋白質の共有捕集などの事態を結果する。これらの理由のため、慢性的な過血糖症により起される糖尿血管の進行的閉塞は、グルコースに由来する交叉結合の過度の生成の結果であると考えられている。このような糖尿病性大血管変化及び小血管閉塞は、本発明組成物及び方法を用いて高度グリコシル化産物生成を化学的に抑制することにより、効果的に防止できるのである。

【0043】研究の結果、標的器官における慢性糖尿病障害の進行は、基本的に過血糖症と結びついており、従ってきびしい代謝コントロールによって末梢器官障害を遅延できるか或いは防止できることがわかった。Nicholls ほか、Lab. Invest., 60, No. 4, 486 頁、1989 年、参照；これは、ネズミの糖尿腎臓症におけるアミノグアニジンの効果について論じている。これらの研究は、アミノグアニジンが糖尿ラットの大動脈壁の蛋白質交叉結合を減ずることを確認し、糖尿病にかかっているこの補足的な標的器官についての、先の研究を確証している (Brownlee ほか、Science, 232, 1629~1632 頁、1986 年)。また別の研究では、アミノグアニジンにより、腎臓のイムノグアニジン捕捉が減少することを報告している (Brownlee ほか、Diabetes, 35, Suppl. 1, 42A, 1986 年)。

【0044】アミノグアニジン投与が糖尿病性腎臓病の進行がアミノグアニジン投与により干渉されることについて、別の証拠が、ストレプトゾトシン-糖尿ラットモデルを用いた糖尿病性腎臓病の証明である形態学的変化に関して、報告されている (Brownlee ほか、1

988 年、既述)。これらの研究者達は、糖尿病性腎臓病の主たる形態学的異常である糸状体基質膜の厚さが増大する状態が、アミノグアニジンにより抑止されたことを報告している。

【0045】これらを考えあわせると、これらデータは、本発明の教示により高度グリコシル化最終産物 (AGE) の生成を抑制することにより、糖尿病に由来する形態学的病変の初期でも後期であっても、また AGE の生成による老化についても抑制できることが強く示唆されている、といえる。

【0046】糖尿病による赤血球細胞の変形 (これは細胞膜を更に硬化させる) は、交叉結合が生じることの別の証拠であり、アミノグアニジンはこれを生体内で抑止することが解った。そのような研究では、赤血球細胞 (RBC) の変形 (df) に及ぼす試験化合物の効果調べるため、長期間糖尿病にかかっているニュージーランド産白色ラビットを使用した。試験化合物は、糖尿ラビットに対して 100 mg/kg の割合で経口投与した (Brown ほか、Presentation of Abstract for Association for Academic Minority Physicians, Annual Scientific Meeting, 1989)。

【0047】糖尿ラットにおけるコラーゲンの交叉結合の増加は、アミノグアニジンにより抑止されることがわかった。Oxlund と Andreassen は、「糖尿ラットにおけるコラーゲンの生化学的、生物物理学的安定性の増大は、アミノグアニジン治療により抑止される」、European Association for the Study of Diabetes, 25 回年次総会、525A ページ、Abstract No. 371, 1989 年、において、臍細胞の熱安定性はウレア浴における破砕時間で測定され、また機械的強度も測定されることの効果を述べている。Souli s ほかの「アミノグアニジンは糖尿病ラットの組織の蛍光を減じるがアルブミン尿素は減じない」、NIH Conference on the Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition, Bethesda, Maryland, 1988 年 9 月、22~23, 30 頁、は動脈のコラーゲンについて蛍光及び溶解性を測定した結果、同様の効果を認めている。

【0048】Giambione と Brownlee の「アミノグアニジン治療は、長期ストレプトゾトシン糖尿ラットの腎臓におけるラミニン B1 の mRNA の増大した安定状態レベルを正常化する」、Diabetes, 38, supplement 2, 83A 頁、アメリカ糖尿病学会第 49 回年次総会、1989 年、は、糖尿ラットに対するアミノグアニジン治療が、腎臓におけるラミニン B1 の mRNA の、糖尿病に由来する増加

を抑制する、ことを示している。このことは、アミノグアニジンが基質の過大な生長を抑制し、それにより糸状体膜の肥厚化、腎臓その他の器官における血管系の形態的、機能的劣化を防止する、ことを示している。

【0049】糖尿病の別の結果は、通常慢性糖尿病と結びついた骨形成減退の原因となる、過血糖症に由来する基質骨分化である。動物モデルでは、糖尿病は、基質骨分化を70%減少させた(Am. J. Phys., 238, 1980年)。

【0050】本発明組成物が生体内に、或いは治療目的で使用される場合、使用される化合物もしくは薬剤は生物学的適応性を有することに注意されるべきである。製薬組成物は、本発明薬剤もしくは化合物の治療学的有効量と共に、目的に合致するような既知物質から選ばれた薬学的に受け入れられる担体を、必要に応じ加えて調製される。このような組成物は、投与方法に従い様々な形態で調製される。また、式(1)の、様々な薬学的に受け入れられる付加塩を使用してもよい。

【0051】投与が静脈注射、筋肉注射或いは腹腔内注射により行われる場合、液体状のものが使用されるであろう。経口投与のため、適当な場合固型体、例えば錠剤、カプセルなど、また溶液、懸濁液などの液体状であってもよい。皮膚や眼などの局所的な適用のためには、適当な使薬(ビヒクル)、例えば水、エタノール、プロピレングリコールなどと共に、皮膚や眼に透入させるための担体を加え、溶液、ローション、あるいは軟こうなどの形に調製する。例えばある局部用調剤は、式(1)の化合物を約10%まで含有する。他の身体組織のためには、別の適当な投与体が考えられてもよい。

【0052】本発明方法が治療用に実施される場合、治療動物には、一種又は数種の薬剤が投与される。投与は慣用の方法、例えば経口的、局所的、非経口的、例えば皮内注射、皮下注射、静脈注射、腹腔内注射、など、或いは他の手段で行う。薬剤投与は長期間にわたり、例えば約25mg/kgのレベルで行ってもよい。

【0053】先に述べたように、本発明は、口腔内の非酵素的褐色化による歯の変色抑制方法にもかかわり、この方法は、そのような治療が必要な対象に対し、式

(1)の薬剤を含む組成物を高度グリコシル化最終産物生成を抑制するために十分な量投与することを含む。

【0054】口腔内で生ずる非酵素的褐色化反応により歯の変色が生じる。現在使用されている抗歯垢(しこ)剤は、この非酵素的褐色化反応を促進し、歯の変色汚れを加速する。最近、著しい抗歯垢効果を有するカチオン系殺菌剤が、口腔内の殺菌のための口ゆすぎ用として調製されている。これらの殺菌用薬剤として、アレキシジン、塩化セチルピリジニウム、グルコン酸クロロヘキシジン、ヘキセティジン、塩化ベンズアルコニウムなどがあげられる。

【0055】クロロヘキシジンその他の抗歯こう剤によ

る歯の変色汚れは、メイラード反応によるものであることが明らかである。Nordboは、J. Dent. Res., 58, 1429頁、1979年、において、クロロヘキシジンや塩化ベンズアルコニウムが生体内褐色化反応の触媒作用をすることを報告している。糖誘導体及びアミノ基源を含む混合物に添加されたクロロヘキシジンは、色素形成作用を増大し、メイラード反応の原因となる。またクロロヘキシジンの使用は歯に生ずる薄膜を増大する結果をもたらす。Nordboは、クロロヘキシジンが歯の変色汚れを次の二つの態様で招来することを報告している。その一つは、多数のアミノ基を含む薄膜の生成を増大させることであり、もう一つは、変色産物を生成するメイラード反応の触媒となることである。

【0056】本発明方法によれば、式(1)の化合物が、口腔中に使用するのに適した組成物と調製される。特に適当な処方、活性薬剤を混入した口腔ゆすぎ剤及び歯磨きペーストである。

【0057】本発明の実施にあたっては、口腔ゆすぎ剤や歯磨きペーストを調製するためによく知られた量及び組成の、非毒性の、薬学的に受け入れられる担体を用いて、慣用の方法で調合する。

【0058】式(1)の薬剤は、高度グリコシル化最終産物の生成を抑制するために有効な量を、組成物の形で調製する。この量は勿論使用される薬剤により、また投与形態により異なるが、典型的には投与体の0.01乃至1.0重量%である。

【0059】また、上述方法における薬剤は、経口的或いは非経口的投与により唾液腺で濃縮される。このような投与のため、薬剤を慣用の経口的或いは非経口的投与形態にする。特に好ましい投与形態は、薬剤をビタミン錠剤或いは弗化物錠剤中に混入し、患者、特に幼児患者の同意が最大限に得られるようにすることである。

【0060】式(1)に含まれる化合物は、当業者にはよく知られた化学合成法により調製することが好ましい。式(1)に含まれる化合物のあるものは、化学物質供給企業から容易に入手することができるか、或いは特に処方することにより容易に調製できる。例えば以下の化合物は、Aldrich Chemical Company (米国ウィスコンシン州、ミルウォーキー)から入手しうる：プロパンジアミド(マロニアミド)；3-アミノ-3-イミノプロパンアミドモノヒドロクロリド(マロンアマジジンHCL)；シアノ酢酸ヒドラジド(シアノアセトヒドラジド、シアセトアミド)；メチルスルホニルアセトニトリル；2,2-ジメチル-1,3-ジオキサソ-4,6-ディオン(イソプロピリデンマロネート)；5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサジオリ-2,4-ジオン(ジメドン)；シアノアセトアミド；シアノアセチルウレア；アセトアセチルグリシン；マロン酸ジヒドラジド；2,4-ペンタン

ジオン； 3-オキソブタンアミド；マロン酸； 及びマロン酸モノメチルカリウム（マロン酸モノメチルエステルのカリウム塩）。

【0061】式(1)に含まれ、化学或いは特許文献に記載される他の化合物として、以下に示すような化合物があげられる：シアノ酢酸； メタンスルホニルアセトン； メタンスルホニルアセトアミド； ジエチルマロネート； ジメチルマロネート； エチルメタンスルホニルアセテート； マロノニトリル； メチル4, 4-ジメチル-3-オキソペンタノエート； 4, 4-ジメチル-3-オキソペンタノニトリル； N-メチルアセトアセトアミド； マロン酸モノエチル水素； 1, 3-シクロヘキサジエンジオン； 1, 3-シクロペンタジエンジオン； テトラヒドロフラン-2, 4-ジオン（テトロン酸）； 2, 4-ピロリジンジオン（テトラミン酸）； 1-メチル-2, 4-ピロリジンジオン（Leeほか、J. Am. Chem. Soc., 100, 4225~4236頁、1978年）； 及び5-sec-ブチル-2, 4-ピロリジンジオン（Stickingsほか、Biochem. J., 78, 412~418頁、1961年）。

#### 【0062】

【実施例】本発明は、以下の例を参照することにより、

$$\frac{F_{B+G} - [F_{B+G+C} - (F_C + F_{C+G} + F_{B+G})]}{F_{B+G}} \times 100$$

式中BはBSA、Gはグルコース、Cは試験化合物である。

【0067】種々の試験化合物（1 mM）の褐色化抑制率は以下の通りである。

0%	抑制なし；
56.9%	プロパンジアミド（マロンアミド）；
51.9%	3-アミノ-3-イミノプロパンアミドモノヒドロクロリド（マロンアミジンHCL）；
51.9%	シアノ酢酸ヒドラジド（シアノアセトヒドラジド、シアセトアミド）；
35.8%	メチルスルホニルアセトニトリル；
24.1%	2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキサン-4, 6-ジオン（イソプロピリデン マロネート；メルドラム酸）；
47.1%	5, 5-ジメチル-1, 3-シクロヘキサジエンジオン（ジメジオン）；
35.1%	アセトアセチルグリシン；
69.9%	マロン酸ジヒドラジド；
51.6%	2, 4-ペンタンジオン；
33.2%	3-オキソブタンアミド；
40.6%	マロン酸；
35.8%	マロン酸モノメチルカリウム（マロン酸モノメチルエステルのカリウム塩）。

【0068】上記実験は、蛋白質の高度グリコシル化及

より深く理解されよう。

【0063】<例1>以下の方法は、交叉結合の尺度であるウシ血清アルブミン（BSA）蛍光の、グルコースの媒介による成長を抑制するため使用された、本発明化合物の能力評価を行うよう実施したものである。化合物を無菌条件下で、1.5Mのりん酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）中に400mMのグルコースと100mg/mlのBSAを溶かした濃度で保温した。

【0064】蛍光測定のため、保温混合物の標本を一週間保温後とりだした。夫々の試験化合物に関し、緩衝液中の比較例保温物を化合物のみ（C）、化合物プラスグルコース（G+C）、化合物プラスBSA（B+C）とした。グルコースとBSA（B+G）の保温物の補足的な組を基準比較例として準備し、これに対して化合物の抑制効果を測定した。保温物はそれぞれ3通り作った。

【0065】夫々標本について希釈液で100倍に希釈した後、蛍光（励起、370nm；放射、440nm）を測定した。

【0066】夫々の試験化合物の褐色化抑制率は以下のように計算された。夫々のFは、保温前の蛍光値を減じた1週間保温後の蛍光値を示す。

#### 【数1】

び蛋白質と他の巨大分子との交叉結合の形成と結びついた病変を減じるため、これら薬剤を用いた治療が効果をもつであろうことを示唆している。この薬剤治療は、糖尿病や老化に伴って生じ、網膜異常、脈管病、腱、靱帯その他関節部分の異常などの余病を生ずる蛋白質の捕捉や交叉結合の増大、を抑制するために採用されてよい。この治療法はまた、糖尿病や老化と共に生じるアテローム性動脈硬化症や結合組織異常を遅らせることができよう。局部的、経口的、非経口的投与形態が考えられる。

#### 【0069】<例2>

錠 剤	mg/錠剤あたり
式(1)の化合物	50
デンプン	50
マンニトール	75
ステアリン酸マグネシウム	2
ステアリン酸	2

【0070】この化合物、デンプン及びラクトースを混合し、デンプンペースで湿性粒状化した。湿性粒状物をトレイ上に置いて45℃の温度で一晩乾燥した。乾燥粒を粉碎器で粉碎して、ほぼ20メッシュの粒径とした。ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、残りをデンプンとして、これらを前記乾燥粒に添加し、適当な錠剤形成プレスで圧縮する前に混合した。次いで4kgの重さを有する11/32"パンチを用いて232mgの重

さの錠剤に圧縮した。これら錠剤は、USP XVIに記  
載された方法により半時間で分解する。

ローション	
式 (I) の化合物	
エチルアルコール	
ポリエチレングリコール 400	
ヒドロキシプロピルセルローズ	
プロピレングリコール	

mg/g	
1.0	
400.0	
300.0	
5.0	
全体を1.0gとする。	

## 【0072】&lt;例4&gt;

口ゆすぎ剤

式 (I) の化合物	1.4 %
グルコン酸クロルヘキシジン	0.12 %
エタノール	11.6 %
ナトリウムサッカリン	0.15 %

歯みがきペースト

式 (I) の化合物	5.5 %
ソルビトールの70%水溶液	25 %
ナトリウムサッカリン	0.15 %
ナトリウムラウリルスルフェート	1.75 %
Carbopol 934, 水の6%分散液	15 %
スペアミント油	1.0 %
水酸化ナトリウムの50%水溶液	0.76 %
二塩基カルシウムフォスフェート	
ジヒドレート	45 %

水を加えて100%とする。

【0074】<例6>歯の表面で生じるような、表面上  
の蛋白質変色を防止する非酵素的褐色化抑制剤の能力を  
更にしらべるため、以下の表面褐色化実験を行った。薄  
膜に被覆された歯の表面の代替物として、露光されずに  
現像された写真紙を用いて、紙の上に蛋白質固定表面  
(ゼラチン質、即ちコラーゲン)を形成した。5ミリメ  
ートル円をパンチし、3 mMのナトリウムアジドを含む  
pH 7.4, 0.5 Mのりん酸塩緩衝液中に、100 m  
Mのグルコース-6-フォスフェートを溶かした溶液を  
用意し、パンチして得られたディスクをこの溶液中に1  
週間浸漬した。グルコース-6-フォスフェートは、グ  
ルコースよりも早く非酵素的褐色化を生じさせる糖であ  
る。グルコース-6-フォスフェートのほかに、クロル  
ヘキシジン及び/もしくは式 (I) の化合物を加えた場  
合の例も得た。保温後、このゼラチン/紙ディスクを水  
ですすぎ、褐色を観察し、写真にとった。

【0075】グルコース-6-フォスフェートのみで保  
温したディスクは、緩衝液のみに浸漬したディスクに較  
べ僅かに褐色が見られた。クロルヘキシジン (商標名 P

## 【0071】&lt;例3&gt;

FD&C Blue No. 1	0.001 %
ペパーミント油	0.5 %
グリセリン	10.0 %
Tween 60	0.3 %
水を加えて100%とする。	

## 【0073】&lt;例5&gt;

5.5 %	
25 %	
0.15 %	
1.75 %	
15 %	
1.0 %	
0.76 %	
45 %	

eridex、最終濃度: 0.04%クロルヘキシジ  
ン)を含有させた場合、著しい褐色化を示した。式

(I) の化合物をクロルヘキシジンに加えた場合には、  
クロルヘキシジンを加えることなく式 (I) の化合物を  
添加した場合と同様に、ゼラチン質の褐色化を完全に抑  
止した。

【0076】ゼラチン質表面にグルコース-6-りん酸  
塩の作用のみにより形成された僅かの褐色を、式 (I)  
の化合物により防止できることは、歯表面の非酵素的褐  
色化を防ぐための本発明の有用性を立証するものであ  
る。クロルヘキシジンの存在による著しい褐色化を式  
(I) の化合物により防止できることは、クロルヘキシ  
ジンと共に生ずる抗歯垢剤により促進される非酵素的褐  
色化を、本発明抑制剤が有効に防止できることを示す。

【0077】本発明は、その範囲を逸脱することなく他  
の形態でも実現しうる。本明細書は従って本発明を限定  
するものではなく、説明するためのものにすぎない、と  
理解されるべきであり、また均等の範囲にある本発明の  
具体例の変更は本発明に含まれる、と理解されるべきで  
ある。



フロントページの続き

(51) Int Cl <sup>s</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
	ADS	8413-4C		
31/195	ABJ	8413-4C		
31/275	ADP	8413-4C		